

УДК 576.895.122 + 591.341.2 + УДК 594.38

**РАЗМНОЖЕНИЕ МАТЕРИНСКИХ СПОРОЦИСТ
*SCHISTOSOMA MANSONI***

© Г. Л. Атаев,* Д. Р. Баженова, А. С. Токмакова

РГПУ им. А. И. Герцена, кафедра зоологии
наб. р. Мойки, 48, С.-Петербург, 191186

* E-mail: ataev@herzen.spb.ru

Поступила 23.10.2015

Выполнено гистологическое исследование развития генеративных элементов материнских спороцист (МС) *Schistosoma mansoni*. В мирации насчитывается в среднем 20 крупных клеток, которые мы определяем как ГК. В каудальной части находится также группа из нескольких недифференцированных клеток (НК). После метаморфоза мирация в спороцисту ГК растут и на третий день начинают дробиться, образуя первые эмбрионы дочерних спороцист. В это время в субтегументарной области тела МС формируются герминальные массы. В дальнейшем пролиферация НК происходит только в герминальных массах. Часть НК дифференцируется в ГК, которые образуют эмбрионы спороцист. Таким образом, формирование генеративных элементов в МС *S. mansoni* происходит в 2 этапа. Первичные ГК образуются в процессе развития мирации в яйце, а вторичные ГК возникают в герминальных массах спороцисты.

Ключевые слова: Trematoda, материнская спороциста, *Schistosoma mansoni*, размножение, генеративные клетки, герминальная масса.

Schistosoma mansoni Sambon, 1907 на протяжении долгого времени являются наиболее интенсивно изучаемыми трематодами. Тем не менее наши сведения о развитии и размножении партенит этого вида базируются на относительно старых работах, хотя и выполненных на разном методическом уровне. Это светомикроскопические (Maldonado, Acosta-Matienzo, 1947; Oliver, Mao, 1949; Shutte, 1974) и электронномикроскопические исследования (Pan, 1965, 1980; Meuleman et al., 1980), а также экспериментальные наблюдения *in vitro* (Bash, DiConza, 1974; Mellink, van den Bovenkamp, 1985). В качестве источника формирования эмбрионов дочерних спороцист всеми авторами признаются генеративные клетки, однако численность последних, их локализация и динамика мультипликации трактуются по-разному. В качестве универсального источника мультипликации генеративных элементов партенит трематод нами признаются герминальные массы. Однако в материнских спороцистах *S. mansoni* эти образования в предыдущих работах не обнаружены. С целью определения механизма

размножения партенит материнского поколения *S. mansoni* было проведено их гистологическое изучение.

В ходе исследования размножения материнских спороцист (МС) *S. mansoni* мы придерживались теории гетерогонии, согласно которой генеративные клетки (ГК) партенит трематод не способны к самовоспроизведению. Деление ГК всегда приводит к образованию двух неодинаковых по своим размерам бластомеров и должно трактоваться как неравномерное дробление. Пополнение же числа ГК осуществляется исключительно за счет деления недифференцированных клеток (НК). НК также могут быть отнесены к герминальному материалу, так как в результате их дифференциации образуются либо ГК, либо структурные элементы органов размножения партенит — герминальных масс (см. обзоры: Атаев, 2000; Dobrovolskij, Ataev, 2003; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Обособление клеток половой линии происходит еще во время эмбриогенеза мирацидия и в дальнейшем сохраняется на протяжении всего онтогенеза МС.

При этом мирацидии разных трематод могут отличаться по составу генеративных элементов, включающих либо только НК, либо НК и ГК или только ГК. Это основные варианты, однако есть и другие, являющиеся, очевидно, производными. Так, у мирацидиев некоторых видов (например *Echinostoma paraense*) наряду с ГК обнаруживаются небольшие эмбрионы (Ataev et al., 2001), а в педогенетических личинках *Philophthalmus rhionica* находится зрелый эмбрион материнской редии, сформированный в результате развития единственной ГК (Атаев, Добровольский, 1990).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальное заражение моллюсков *Biomphalaria glabrata* Say мирацидиями *Schistosoma mansoni* проведено в Лаборатории биологии животных Перпеньянского университета (Франция). Средняя доза заражения составила 9 личинок. Зараженные улитки содержались в аквариумах при 26 °С. Для гистологического изучения моллюски фиксировались в жидкости Буэна. Материал фиксировался через 2, 4, 6, 12 дней после заражения (п. з.). Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином Эрлиха с последующей подкраской водным раствором эозина.

Для гистологического изучения мирацидиев применялась модифицированная методика заливки в желатин-парафин (Langeron, 1949). Были изготовлены полные серии срезов толщиной 3 мкм. Для окраски использовался гематоксилин Майера с последующей подкраской водным раствором эозина.

Изучение и микрофотографирование проводились на микроскопе Leica DM 5000, рисунки выполнялись на микроскопе Leica DM 1000 с помощью рисовального аппарата L3/20.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стадия мирацидия. Результаты изучения клеточного состава мирацидиев *Schistosoma mansoni*, выполненного с помощью гистологических методов, не позволяют нам достоверно определить характер генеративных эле-

ментов. Это пока не удалось сделать и авторам, использовавшим данные электронной (Pan, 1980) и конфокальной микроскопии (Collins et al., 2011). Во всех работах указывается, что ГК расположены в задней половине личинок. При этом только немногие исследователи (Voge, Seidel, 1972; Добровольский и др., 2000; Dobrovolskij, Ataev, 2003; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003) поднимали вопрос об однородности этих клеток. Учитывая, что МС *S. mansonii* реализуют генеративную функцию в основном на паразитической фазе развития, возможны два варианта: либо в мирациях этого вида имеются только НК, либо кроме них есть и созревающие ГК. Зрелых ГК, готовых к дроблению на личиночной стадии МС, нет. На это указывает рост этих клеток уже на спороцистоидной стадии.

Всего в мирации *S. mansonii* по разным источникам насчитывается от 20—27 (Ottolina, 1957; Voge, Seidel, 1972; Schutte, 1974; Pan, 1980) до 50—61 ГК (Maldonado, Acosta-Matienzo, 1947; Olivier, Mao, 1949). Скорее всего, в этих работах считались все клетки, имеющие отношение к генеративным элементам: НК, созревающие и зрелые ГК. В любом случае эти клетки расположены в двух или более смежных группах (Schutt, 1974) в задних двух третях тела мирации (Olivier, Mao, 1949; Pan, 1980).

По нашим данным, в мирации *S. mansonii* насчитывается в среднем 20 крупных клеток, которые мы определяем как ГК (рис. 1, см. вкл.). Они образуют С-образный клеточный тяж, начинающийся в каудальной части тела личинки, а спереди достигающий ее ганглия. На уровне 3-го ряда эпителиальных пластинок мирация этот тяж смещается к стенке тела личинки, обходя расположенную здесь зону экскреторных канальцев. Вероятно, это смещение и приводит к распадению единого пула ГК на 2 группы клеток (больше мы не отмечали). В результате складывается впечатление о независимой закладке ГК в нескольких участках тела мирации (Schutt, 1974, и др.). В составе тяжа клетки расположены плотно. Есть данные, что тесный контакт между ГК поддерживается за счет многочисленных небольших выростов на их поверхности, армированных микротрубочками (Collins et al., 2011). Однако возможно другое объяснение плотной упаковки герминального материала в мирации *S. mansonii*. На электронно-микроскопическом уровне показано, что ГК в личинке окружены цитоплазматическими отростками паренхиматозных (интерстициальных) клеток (Meuleman et al., 1980; Pan, 1980). Возможно, этот паренхиматозный матрикс и является структурной основой тяжа ГК.

Согласно нашим результатам, размеры ГК в мирациях *S. mansonii* в среднем составляют 6.3 ± 0.4 мкм ($n = 30$). Диаметр их ядра — 4.5 ± 0.2 мкм, а ядрышка — 1.5 ± 0.1 мкм. Наиболее крупные ГК достигают 9.7 мкм в диаметре (ядро 5.8 мкм), а минимальные размеры составляют 4.4 мкм (ядро 3.1 мкм). Эти результаты в целом подтверждают данные других авторов (Voge, Seidel, 1972; Schutte, 1974; Pan, 1980, и др.).

Важно отметить, что многими авторами (Olivier, Mao, 1949) отмечалось наличие среди ГК нескольких клеток (по нашим данным — 2—3), выделяющихся более крупными размерами (рис. 1, Б). Вероятно, именно эти клетки раньше других достигают зрелости и приступают к дроблению (см. ниже).

Независимо от размеров все ГК имеют пузырьковидное (за счет деконденсации гетерохроматина) ядро с хорошо заметным ядрышком, окружен-

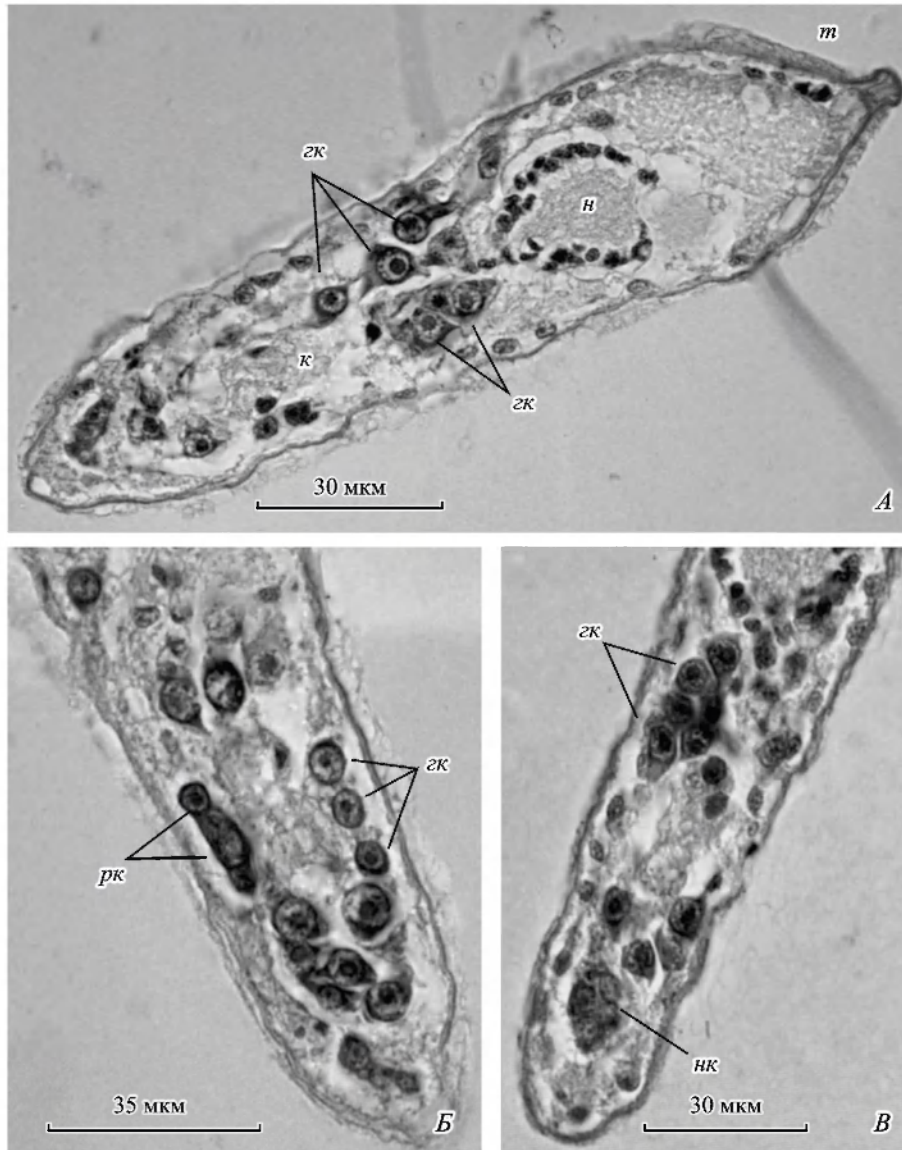


Рис. 1. Продольные срезы мирацидиев *Schistosoma mansoni* (А—В).
гк — гестеративные клетки, к — зона канальцев выделительной системы, н — первая масса, нк — педиференцированные клетки, рк — ретикулярные клетки («ret-cells»), т — теребраториум.

Fig. 1. Longitudinal sections of *Schistosoma mansoni* miracidia (A—B).

ное базофильной цитоплазмой с полирибосомами и развитыми митохондриями (Meuleman et al., 1980). Форма клеток может варьировать от округлой до умеренно веретеновидной. В целом эти клетки выглядят, как приступившие к дифференциации и, вероятно, являются созревающими ГК. Кроме этих крупных и хорошо окрашиваемых ГК (морфологически идентичных ГК из спороцист (Schutt, 1974)), мы допускаем наличие в мирацидиях *S. mansoni* НК. Они меньше (диаметр 4—5 мкм), в их ядрах более выражен гетерохроматин, а цитоплазма не столь базофильна по сравнению с ГК. К сожалению, точно определить количество и локализацию НК пока не удалось, хотя подобные клетки заметны в задней половине тела личинок и обозначаются как «ret-cells» (Schutt, 1974). Проблема заключается в том, что внешне разделить НК герминальной и соматической природы невозможно. Тем не менее интенсивное размножение МС на паразитической стадии косвенно подтверждает существование НК.

Скорее всего, НК соматической природы (ret-cells) расположены вдоль покровов мирацидия. На срезах они выглядят в виде характерных скоплений — «цепочки» (рис. 1, Б). В свою очередь мультипликация генеративных элементов обеспечивается пролиферацией НК, представленных в мирацидии группой из 3—5 клеток и занимающих каудальное положение (рис. 1, Б).

Стадия спороцисты. После проникновения мирацидия в моллюска в непосредственной близости от покровного эпителия происходит его метаморфоз в спороцисту (Olivier, Mao, 1949; Pan, 1965, 1996; Schutt, 1974; Kalhor, Shah, 2010, и др.). Этот процесс затрагивает почти все провизорные органы и продолжается, как и у других трематод, около суток. Однако состав герминального материала в течение этого времени остается без заметных изменений (Olivier, Mao, 1949; Pan, 1965; Voge, Seidel, 1972; Schutt, 1974). Все исследователи отмечают, что количество ГК в спороцистах в начале инвазии остается на уровне мирацидия (по нашим данным — около 20 клеток). При этом меняется организация герминального материала. Единый тяж ГК распадается, и клетки постепенно распределяются по всему объему МС.

На второй день развития спороцисты (рис. 2, А, Б, см. вкл.) наблюдается рост ГК, в результате которого через 2 дня п. з. их размеры достигают 8.3 ± 0.4 мкм (ядро — 5.8 ± 0.2 мкм, ядрышко — 1.8 ± 0.1 мкм) ($n = 28$). Одновременно с ростом ядер в них наблюдается деконденсация гетерохроматина. Ядро теперь окружено узким слоем цитоплазмы, которая к этому моменту становится отчетливо базофильной. Это уже полностью сформированные ГК, готовые к дроблению. Первые эмбрионы дочерних спороцист (ДС) заметны на третий день п. з. Сходные сроки начала размножения МС указаны Паном (Pan, 1965, 1996). Через 6 дней п. з. в подросших спороцистах заметны эмбрионы на разной стадии развития, наиболее крупные из которых состоят из 30 и более бластомеров (рис. 2, В).

Дальнейшая мультипликация генеративных элементов связана с особыми органами размножения партенит — герминальными массами. Общая морфология герминальных масс как источника ГК редий и спороцист изучена для многих трематод — прежде всего в работах Корта с соавт. (Cort et al., 1954, и др.). Позднее эти образования были признаны в качестве универсальных органов размножения партенит (Атаев, 2000; Dobrovolskij,

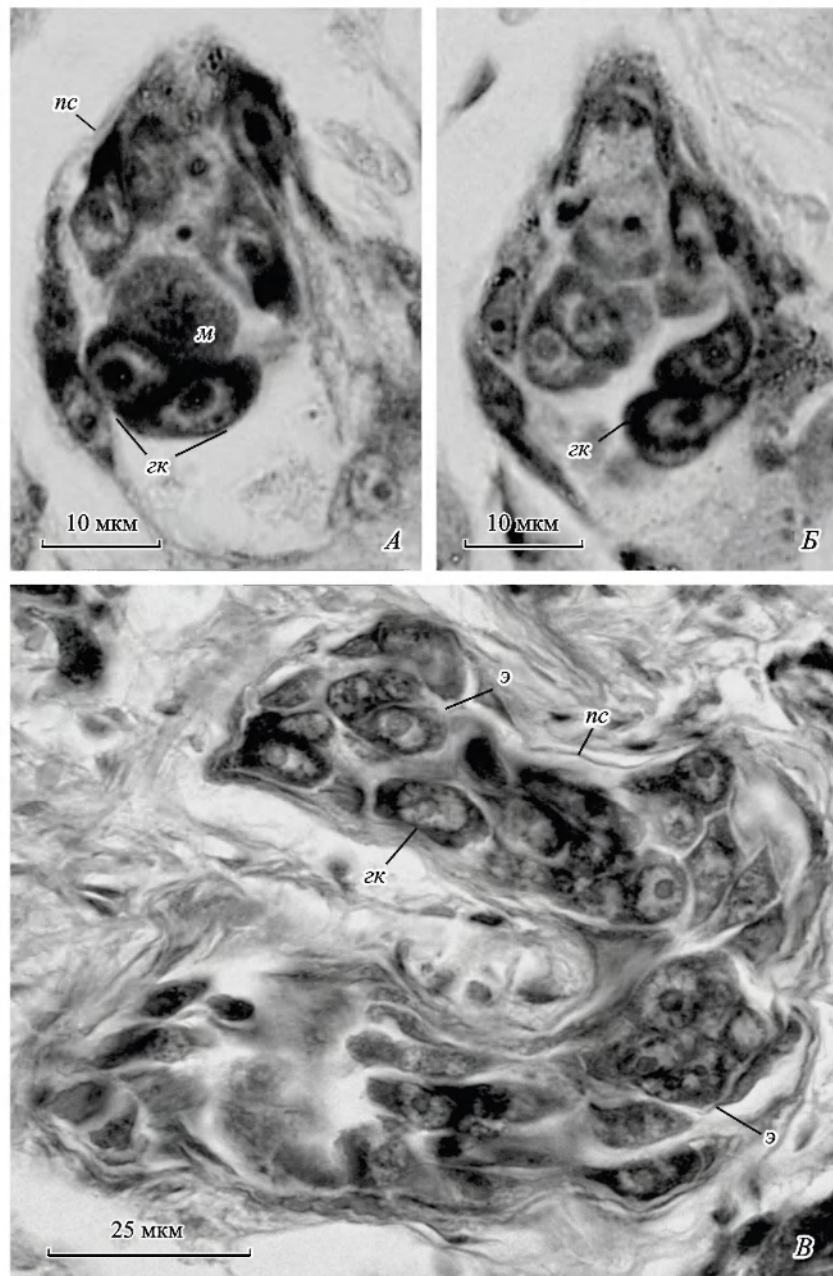


Рис. 2. Гистологические срезы материнской спороцисты *Schistosoma mansoni* (A—B).
 А, Б — срез через материнскую спороцисту через 2 дня п. з.; В — продольный срез через материнскую спороцисту через 6 дней п. з. гк — генеративные клетки, м — митоз (дробление генеративной клетки),
 nc — покровы спороцисты, э — эмбрион.

Fig. 2. Histological sections of *Schistosoma mansoni* mother sporocyst (A—B).

Ataev, 2003; Атаев и др., 2013). Однако для большинства исследователей герминальные массы остаются морфологически и функционально неясными структурами, поэтому при анализе размножения конкретных видов в большинстве работ они вообще не учитываются.

Для спороцист *S. masoni* герминальные массы описаны у спороцист дочернего поколения (Olivier, Mao, 1949), а у МС их существование ранее отрицалось (Olivier, Mao, 1949; Schutte, 1974), хотя в своей работе Шутт (Schutt, 1974) на рис. 6 отчетливо изобразил клеточную структуру, представляющую собой центр мультипликации генеративных элементов. Именно такие образования были найдены нами в 12-дневных МС и обозначены как герминальные массы (рис. 3, см. вкл.). Образование последних происходит уже к 6-му дню п. з., однако обнаружить их в это время непросто, так как в их состав входят только НК и ГК на разной стадии созревания. Во всех случаях герминальные массы расположены субтегументально и в своем основании представлены скоплением НК.

Сформированные герминальные массы *S. masoni* имеют ранжированную (Cort et al., 1954; Dobrovolskij, Ataev, 2003) или зональную структуру (Добровольский и др., 1983, 2000; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Ближе к их основанию (со стороны стенки тела спороцисты) находится несколько НК, а по мере удаления от него расположены все более крупные ГК. Соответственно среди созревающих ГК наблюдается отчетливо выраженный градиент. На вершине герминальной массы наблюдается дробление ГК. Через 12 дней п. з. в ее составе имеются 1—2 эмбриона. В отличие от большинства трематод они недолго развиваются в составе герминальной массы — примерно до стадии 10—15 бластомеров. К этому времени на поверхности эмбрионов формируется зародышевая мембрана, и они переходят к развитию в полости схизоцеля. Герминальная масса продолжает обеспечивать закладку новых эмбрионов ДС. В каждой спороцисте имеется не менее 4 таких образований, что приводит к быстрому росту числа зародышей — уже через 14 дней п. з. их количество достигает от двух до трех сотен эмбрионов (Olivier, Mao, 1949).

Интересно отметить, что начало формирования первых эмбрионов в герминальных массах (10—12 дней п. з.) совпадает с началом отрождения первых ДС, которые образуются из ГК, представленных в мирацидии («первичные ГК»). У материнской спороцисты *S. masoni* отсутствует родильная пора, следовательно, созревающие разновозрастные эмбрионы дочерних спороцист выходят из материнского организма, разрывая стенку тела последней (Shutte, 1974; Meuleman et al., 1980).

Обнаружение герминальных масс позволяет предложить следующую схему размножения спороцист *S. masoni* материнского поколения. В мирацидии герминальный материал представлен примерно 20-ю первичными ГК, а также НК, количество и локализация которых требуют дополнительного изучения. В течение первых двух дней п. з. эти клетки растут и на третий день начинают дробиться, образуя первые эмбрионы ДС. В это же время в субтегументальной области тела спороцисты начинают оформляться герминальные массы, заметные в 6-дневных МС. Именно в их составе происходит деление НК, часть которых дифференцируется во вторичные ГК. Возможно, источником образования герминальных масс являются НК, отмеченные нами в мирацидии (см. выше).

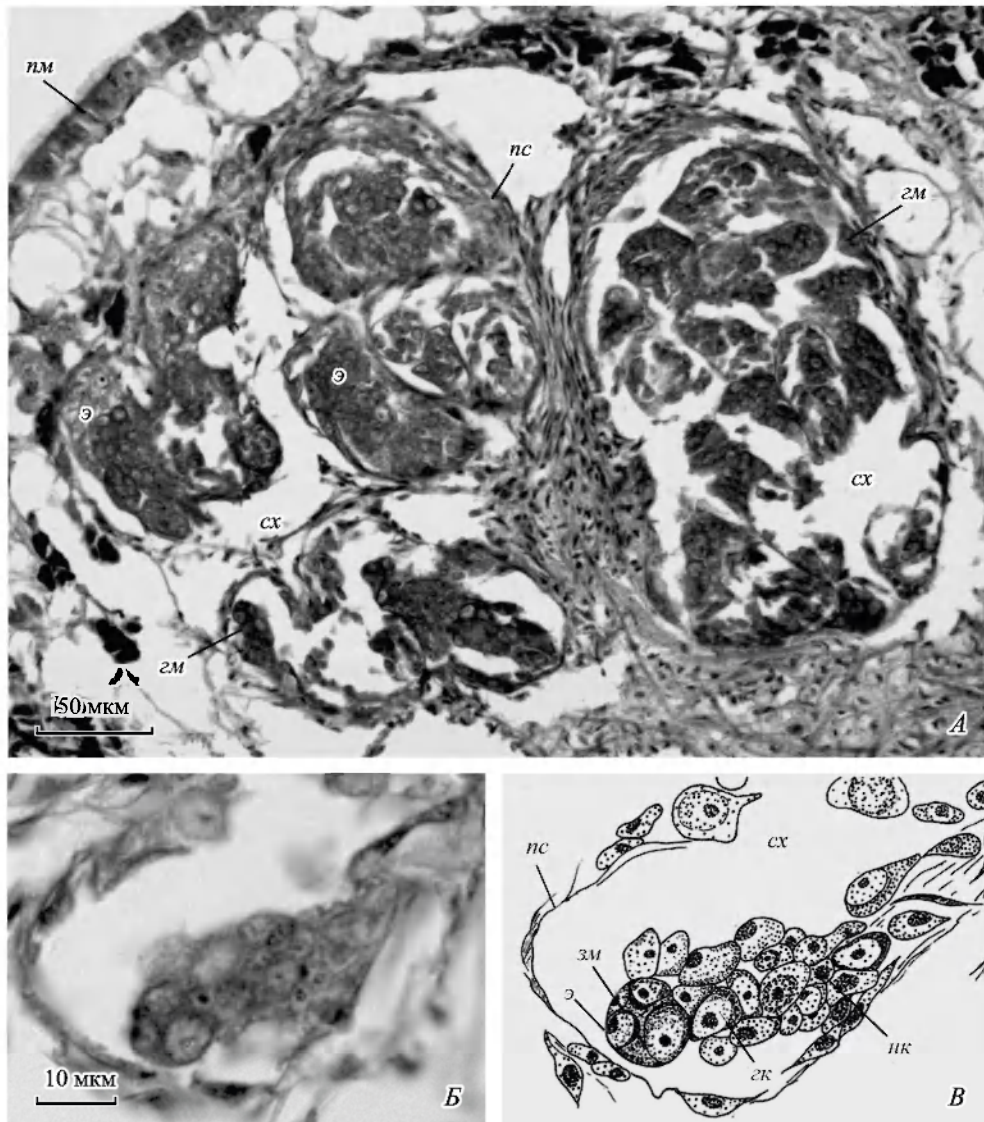


Рис. 3. Гистологические срезы материнской спороцисты через 12 дней п. з. (А—В).
 А — срез через материнскую спороцисту, В — срез через герминальную массу. В — рисунок герминальной массы. гм — герминальная масса, зм — зародышевая мембрана, лм — покровы моллюска, сх — схи-
 зоцель спороцисты. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. Histological sections of a mother sporocyst 12 days after infection (A—B).

По мере созревания эти клетки начинают дробиться, образуя эмбрионы ДС. Последние в составе герминальной массы развиваются до стадии зародышевого шара и переходят к флотированию в схизоцеле спороцисты. Именно появление большого количества эмбрионов по всему объему тела МС и создает впечатление хаотичности их закладки.

Таким образом, формирование генеративных элементов в МС *S. mansoni* происходит в два этапа. Первичные ГК образуются в процессе развития мирацидия в яйце, а вторичные ГК возникают в герминальных массах спороцисты.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации ГЗК № 6.1278.2014/К.

Список литературы

- Атаев Г. Л. 2000. Развитие партенит трематод. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб. 335 с.
- Атаев Г. Л., Добровольский А. А. 1990. Развитие микрогемипопуляции партенит трематод *Philophtalmus rhionica*. Паразитология. 24 (6): 499—508.
- Атаев Г. Л., Добровольский А. А., Токмакова А. С. 2013. Размножение партенит трематод *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Leucochloridiidae). Паразитология. 47 (2): 178—182.
- Добровольский А. А., Галактионов К. В., Мухамедов Г. К., Синха Б. К., Тихомиров И. А. 1983. Партеногенетические поколения трематод. Тр. Ленинград. общ-ва естествоисп. Л.: Изд-во ЛГУ. 82 (4): 1—108.
- Добровольский А. А., Галактионов К. В., Атаев Г. Л. 2000. Особенности организации генеративного материала и динамика размножения материнских спороцист трематод. Паразитология. 34 (1): 14—22.
- Ataev G. L., Dobrovolskij A. A., Avanesian A. V., Loker E. S. 2001. Germinal elements and their development in *Echinostoma caproni* and *Echinostoma paraensei* (Trematoda) miracidia. Journal of Parasitology. 87 (5): 1160—1164.
- Bash P. F., DiConza J. J. 1974. The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni* surface changes in vitro with ultrastructural correlation. Journal of Parasitology. 60 (6): 935—941.
- Collins J. J., King R. S., Cogswell A., Williams D. L., Newmark P. A. 2011. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. PLoS Neglected Tropical Diseases. 5 (3): e1009.
- Cort W. W., Ameel D. J., van der Woude A. 1954. Germinal development in the sporocysts and rediae of the digenetic trematodes. Experimental Parasitology. 3(2): 185—225.
- Dobrovolskij A. A., Ataev G. L. 2003. The nature of reproduction of digenea rediae and sporocysts. In: Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites. Presses Universitaires de Perpignan. 249—272.
- Galaktionov K. V., Dobrovolskij A. A. 2003. The biology and evolution of trematodes. An essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes. Dordrecht, Boston, London. Kluwer academic publishers. 592 p.
- Kalhor I. B., Shah Q. A. 2010. Histological studies of the mother sporocysts of *Schistosoma mansoni* developed in the susceptible and resistant snails of *Biomphalaria glabrata*. Pakistan Veterinary Journal. 30: 1—6.
- Langeron M. 1949. Précis de microscopie. 7 édition. Paris, Masson & Cie. 1429 p.
- Maldonado J. F., Acosta-Matienzo J. 1947. The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Australorbis glabratus*. The Puerto Rico journal of public health and tropical medicine. 22: 374—404.

- Mellink J. J., van den Bovenkamp W. 1985. In vitro culture of intramolluscan stages of the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Zeitschrift für Parasitenkunde. 71: 33—351.
- Meuleman E. A., Holzmann P. J., Peet R. C. 1980. The development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. Zeitschrift für Parasitenkunde. 61: 201—212.
- Olivier L., Mao C. P. 1949. The early larval stages of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 in the snail host, *Australorbis glabratus* (Say, 1818). The Journal of Parasitology. 35 (3): 267—275.
- Ottolina C. 1957. El miracidio del *Schistosoma mansoni*. Revista de Sanidade y Assistencia Sociale. 22: 1—435.
- Pan S. C. 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 14 (6): 931—975.
- Pan S. C. 1980. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. Journal of Invertebrate Pathology. 36 (3): 307—372.
- Pan S. C. 1996. Review: *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host — parasite interactions. Japanese journal of medical science & biology. 49 (4): 129—149.
- Schutte C. H. J. 1974. Studies on the South African strain of *Schistosoma mansoni*. Part 2. The intra—molluscan larval stages. South African Journal of Science. 70: 327—345.
- Vogel M., Seidel J. S. 1972. Transformation in vitro of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* into young sporocysts. The Journal of Parasitology. 58 (4): 699—704.

REPRODUCTION OF SCHISTOSOMA MANSONI MOTHER SPOROCTYST

G. L. Ataev, D. R. Bazhenova, A. S. Tokmakova

Key words: Trematoda, mother sporocysts, *Schistosoma mansoni*, reproduction, germinal cells, germinal mass.

SUMMARY

The development of generative elements of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts (MS) was examined by histological methods. About 20 large cells, on average, determined as germinal cells (GC) were found in the miracidium. These cells formed a C-shape cellular aggregation (a band) beginning in the caudal part of the larva, and reaching the nerve ganglion in the anterior part. At the level of the 3d tier of epithelial plates of the miracidium, this band shifted to the external body wall, bypassing the zone of excretory channels. Apparently, this shift resulted in the subdivision of a single pool of GC into two structurally associated groups. A group of several undifferentiated cells (UC) was also revealed in the caudal part of the body.

After the metamorphosis of the miracidium into sporocysts, GC had increased in size and on the 3d day started to divide, forming first embryos of daughter sporocysts. During the same time, germinal masses were being formed in the subtegumental area of the MS body. Since this time point, proliferation of UC occurred only in germinal masses. A part of UC also differentiated there into GC. These cells formed sporocystoid embryos, developing as far as the germinal ball, and then came out into the sporocyst schizocoel (approximately in 10 days p. i.). Thus, in *S. mansoni*, the formation of generative elements into MS occurs in two stages. Primary GC are formed during the development of the miracidium into the egg, whereas secondary GC develop in germinal masses of the sporocyst.